

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 644 066
Il n'existe que pour les commandes de reproduction

(21) N° d'enregistrement national : 89 03086

(51) Int Cl^e : A 61 K 37/36, 47/36.

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 9 mars 1989.

(71) Demandeur(s) : THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES,
Groupement d'intérêt public — FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOP1 « Brevets » n° 37 du 14 septembre 1990.

(72) Inventeur(s) : Denis Barriault ; Jacqueline Jozefonvicz ; Fabrizi Slavai ; Michèle Tardieu ; Jean-Pierre Caruelle ; José Courty.

(50) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Ores.

(54) Compositions stabilisées comprenant des FGFs, leur procédé d'obtention et leurs applications thérapeutiques, chirurgicales et cosmétologiques.

(57) Compositions stabilisées contenant des facteurs de croissance des fibroblastes FGFs, leur procédé d'obtention ainsi que leurs applications *in vitro* telles que stockage des FGFs et cultures cellulaires et *in vivo* comme agent thérapeutique, notamment pour la cicatrisation et la régénération tissulaire ou comme agent cosmétique.

Lesdites compositions comprennent pour leur stabilisation un polysaccharide associé avec au moins un FGF acide et/ou un FGF basique et/ou un dérivé et/ou un analogue et/ou un fragment de ceux-ci présentant une activité biologique.

A1

FR 2 644 066

1

La présente invention est relative à des compositions stabilisées contenant des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs), à leur procédé d'obtention ainsi qu'à leurs applications *in vitro* telles que stockage des 5 FGFs et cultures cellulaires et *in vivo* comme agent thérapeutique, notamment pour la cicatrisation et la régénération tissulaire ou comme agent cosmétique.

Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs) ont été mis en évidence par de nombreuses équipes, à 10 la suite des études des activités biologiques des facteurs de croissance, obtenus à partir d'extraits d'un très grand nombre de tissus ou d'organes (cerveau, hypophyse, rétine, 15 humeur vitrée, choroïde, iris, cartilage, rein, foie, placenta, *corpus luteum*, prostate, os, muscle etc...)

15 La diversité même des tissus étudiés et des cellules stimulées par ces facteurs *in vitro* et *in vivo*, ainsi que le grand nombre d'équipes qui ont indépendamment contribué à la caractérisation, l'isolement et l'identification complète de ces facteurs, explique la multitude de 20 noms et sigles donnés par ces différents auteurs pour les désigner.

Il apparaît que tous ces extraits contiennent 25 des facteurs de croissance de la famille des FGFs et que cette famille peut être divisée en deux branches principales.

La première branche a été décrite sous les noms de FGF basique, de facteur basique de croissance des fibroblastes ou de type 2 affin pour l'héparine ou "Heparin Binding Growth Factor II" (HBGF II), de facteur de croissance dérivé du cerveau ou Brain-Derived Growth Factor (BDGF), de facteur de croissance dérivé de l'œil ou Eye-Derived Growth Factor II (EDGF II), de facteur de croissance des astrocytes II ou AGF II, de facteur de croissance dérivé du cartilage (CDGF) etc... alors que la deuxième 35 branche de la famille FGF a été décrite sous les noms de

FGF acide ou facteur affin pour l'héparine de type I (HBGF I), facteur dérivé du cerveau ou BDGF I, etc...

Ces facteurs ont été nommés soit selon le type de cellules cibles utilisées (facteurs de croissance des fibroblastes, astrocytes ou cellules endothéliales avec les sigles FGF, AGF, ECGF), soit selon la source à partir de laquelle ce facteur est extrait (exemple : facteur de croissance dérivé du cerveau, dérivé de la rétine ou des yeux, du cartilage, d'hépatocytes en culture avec respectivement les sigles BDGF, RDGF, EDGF, CDGF, HDGF...), soit encore selon une propriété biochimique ou biologique (facteurs de croissance affins pour l'héparine (HBGF) ou facteur tumoral angiogénique (TAF) ; les deux principales branches de la famille sont nommées selon ces sigles, précédés ou suivis de acide ou basique, ou type I ou type II.

C'est en suivant l'activité biologique sur des cellules en culture que ces facteurs ont pu être purifiés. Les premières caractéristiques physicochimiques (poids moléculaire et point isoélectrique) ont été publiées dès 1975 (GOSPODAROWICZ, J. Biol. Chem. 250, 2515) pour la forme basique et en 1982 (BARRITAULT et al., J. Neurosci. 2, 477-490) pour la forme acide.

La purification à homogénéité des deux formes du FGF a permis d'établir leurs structures primaires (ESCH, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. US, 82, 6507 pour la forme basique et GIMENEZ G. et al., 1985, Science, 230, 1385-1388 pour la forme acide).

L'isolement des deux formes a été grandement favorisée par la mise en évidence d'une forte affinité de ces facteurs pour l'héparine et l'utilisation subséquente d'une chromatographie d'affinité sur héparine immobilisée (SHING et al., 1984, Science, 223, 1296-1299).

Il est connu que, *in vitro*, les FGFs sont capables de stimuler la prolifération et la différenciation d'un grand nombre de cellules provenant de tissus et d'espèces différents.

3

On peut citer notamment les cellules fibroblastiques, endothéliales, épithéliales, les kératinocytes, chondrocytes, myoblastes, astrocytes etc.,... ainsi que la survie neuronale.

5 Il est également connu que, *in vivo*, les FGFs présentent des propriétés neurotrophiques, angiogéniques et cicatrisantes.

On peut citer notamment le Brevet français 79 18282, qui enseigne un procédé de stimulation de la 10 croissance des cellules épidermiques ; ce procédé montre en particulier le rôle d'un extrait aqueux de rétine partiellement purifié et contenant du FGF sur la stimulation desdites cellules épidermiques.

On connaît également le Brevet américain 15 4 477 435, qui enseigne une méthode de cicatrisation de l'épithélium cornéen à l'aide d'une composition contenant un extrait aqueux de rétine.

On connaît également de nombreux travaux concernant la mise en évidence et la caractérisation des 20 FGFs et leur rôle dans la régénération et la cicatrisation de la peau, des vaisseaux, des nerfs, des os, des muscles etc... tant *in vitro* qu'*in vivo*.

On peut citer en particulier le Brevet américain 4 444 760, qui décrit un facteur de croissance acide 25 dérivé du cerveau, son procédé d'extraction et son application à la cicatrisation des plaies et la demande de Brevet européen 186 084 qui décrit une méthode de stimulation de la croissance des cellules endothéliales vasculaires à l'aide d'une composition contenant le facteur de croissance 30 acide dérivé du cerveau décrit précédemment.

Les FGFs décrits ci-dessus sont obtenus par purification ; on connaît par ailleurs, par la Demande internationale PCT US86/01879, des FGFs obtenus par recombinaison génétique.

35 Une autre composition cicatrisante à base d'au moins un FGF est décrite dans la Demande de Brevet européen

4

243 179 et comprend en outre du collagène et de l'héparine et/ou un glycoaminoglycane.

Dans ces différents documents, l'application topique du FGF, seul ou associé, est réalisée à l'aide de formulations usuelles telles que crèmes, pâtes, solutions, gels ou associées à des polymères, des éponges et des pompes permettant un relargage lent des FGPs, comme cela est en particulier décrit dans la demande Internationale PCT US86/01879, dans laquelle il est précisé que des formulations comprenant des FGPs recombinants et des excipients ou des molécules de transport appropriés peuvent être préparées, notamment des lotions, des gels, des formes retard ou des crèmes, ledites formulations étant éventuellement associées à d'autres principes actifs, tels que des antibiotiques. Les formes retard, décrites dans cette Demande, comprennent en particulier des polymères.

Les compositions obtenues peuvent notamment être utilisées comme cicatrisant, dans le contrôle de la coagulation, dans l'amélioration des dommages neurologiques et dans la régénération des tissus durs.

Il apparaît toutefois, que le FGF ne présente pas systématiquement une stimulation de la cicatrisation ; en effet une absence de stimulation a été notamment rapportée dans J. Dermatol. Sing. Oncol. ; de ce fait, l'application topique de FGF acide ou basique doit souvent être itérative, pour obtenir les effets maximaux, bien que certaines compositions de l'Art antérieur telles que des éponges d'alcoolpolyvinyle imbibées de FGPs, appliquées sous la peau, entraînent une prolifération fibroblastique et myoblastique.

Ceci est dû à une instabilité thermique de la molécule, à une inactivation de la molécule liée au pH, à une protéolyse par des enzymes, ainsi qu'à une interaction entre les FGPs et les glycoaminoglycane comme l'héparane sulfate ou le protéohéparane sulfate des membranes cellulaires ou des membranes basales, entraînant une immobilisa-

tion des FGFs pouvant empêcher leur accès aux récepteurs cellulaires.

De tels inconvénients limitent les possibilités de stockage et d'exploitation des FGFs.

5 La Demanderesse s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à des compositions contenant des FGFs qui répondent mieux aux nécessités de la pratique que les compositions visant au même but proposées dans l'Art antérieur, notamment en ce que les compositions conformes à 10 l'invention ont une stabilité nettement améliorée, permettant un stockage plus aisé et de ce fait un effet thérapeutique supérieur aux compositions de l'Art antérieur et en ce que leur fréquence d'application est ainsi nettement diminuée.

15 La présente invention a pour objet une composition à base de FGF, caractérisée en ce qu'elle comprend pour sa stabilisation au moins un polysaccharide associé à au moins un FGF acide et/ou un FGF basique et/ou un dérivé et/ou un analogue et/ou un fragment de ceux-ci présentant 20 une activité biologique.

Selon un mode de réalisation avantageux de la composition conforme à l'invention, ledit polysaccharide est un dextrane substitué fonctionnalisé approprié.

25 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, les dextrans substitués fonctionnalisés sont choisis dans le groupe qui comprend des dextrans solubles et des dextrans insolubles, lesdits dextrans étant capables de restaurer partiellement ou totalement 30 l'activité biologique du/des facteurs FGF acides et/ou basiques inactivés par un stockage de longue durée ou la température.

On entend par dextrans solubles substitués fonctionnalisés, ceux qui sont notamment décrits dans le Brevet français n° 2 555 589 ou dans le Brevet français 35 n° 2 461 724.

6

On entend par dextranes insolubles substitués fonctionnalisés, ceux qui sont notamment décrits dans la Demande de Brevet français n° 82 01641 ou dans le Brevet français n° 2 461 724.

5 De tels dextranes sont stables et ne perdent pas leurs propriétés avec le temps.

10 Selon encore un autre mode de réalisation de la composition conforme à l'invention, celle-ci comprend de 0,1 à 1 000 µg/ml d'un ou plusieurs dextranes substitués fonctionnalisés et de 0,01 ng à 300 µg de FGF acide et/ou de FGF basique et/ou d'un dérivé et/ou d'un analogue et/ou d'un fragment de ceux-ci présentant une activité biologique.

15 Selon un autre mode de réalisation de la composition conforme à l'invention, celle-ci comprend, de plus, d'autres principes actifs associés.

20 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits principes actifs sont choisis dans le groupe qui comprend notamment les anesthésiques locaux, les antiinfectieux, des protéines sériques, du collagène.

25 On peut citer notamment, comme anesthésique local, la lidocaïne, comme substances bactériostatiques, les sels de sodium, les sels d'argent, leurs dérivés ou des sulfadiazines. On peut citer comme antibiotique, la streptomycine ; on peut citer comme protéine sérique, la sérum albumine ou la fibronectine ; on peut citer également des collagènes solubles et de l'élastine.

30 Selon un autre mode de réalisation de ladite composition, celle-ci comprend, en outre, au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou un support physiologiquement acceptable.

35 Conformément à l'invention, lorsque le véhicule est de l'eau, ladite composition comprend en outre des tampons et/ou des sels appropriés, de manière à maintenir le mélange approximativement à un pH compris entre 6,8 et 7,4 et à une force ionique comprise entre 0,1 et 0,2.

7
Une telle composition conforme à l'invention est ci-après dénommée composition "matrice".

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, celle-ci est associée à des 5 liposomes.

Une telle composition conforme à l'invention est ci-après dénommée composition PGF-dextrane-liposome.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, le support est choisi dans le groupe 10 qui comprend notamment les pansements et les biomatériaux.

La composition conforme à l'invention, est sous forme d'aérosol, lorsque le véhicule est un gaz approprié.

La composition "matrice" est avantageusement appliquée directement en solution ou en aérosol.

15 Conformément à l'invention, ladite composition, notamment ladite composition "matrice" est incluse dans une forme galénique telle que pommade, crème, pâte, lotion ou imprègne un gel, notamment un gel de collagène.

20 Egalement conformément à l'invention, ladite composition, notamment ladite composition "matrice" est incluse et/ou imprègne un support approprié tel que pansement ou biomatériau favorisant directement ou indirectement la réparation cellulaire (par exemple, un fil de suture chirurgical ou le corail pour greffe osseuse).

25 Ladite composition "matrice" peut notamment être incluse dans des crèmes ou lotions utilisées traditionnellement, notamment les crèmes à base de lanoline telles que "SILVEADENE", "MARIO", "AQUAPHOR", "EQUALIA", pour des applications sur la peau ; elle peut également 30 être incluse ou imbiber des pansements tels que pansements de textiles, de tissus synthétiques ou d'éponges, ou des produits naturels servant de recouvrement de plaies, par exemple des gels de collagène ou des dermes d'origine animale.

35 Ladite composition "matrice" conforme à l'invention, doit imprégner ces différentes formes de pan-

sements, de manière à ce que le facteur FGF puisse être en contact ou diffuser, seul ou associé au polysaccharide, jusqu'aux tissus cibles.

La composition conforme à l'invention est notamment maintenue sur le site de la blessure et sur les blessures ouvertes, de manière à maintenir l'hydratation selon les techniques de l'homme de l'Art, particulièrement élaborées dans le domaine des greffes de peau.

Les pansements occlusifs peuvent être imprégnés de la même manière, adsorbés ou recouvrir un support naturel ou synthétique.

Pour les applications sur les cornées, le véhicule doit être compatible avec la tolérance oculaire (par exemple, le produit commercialisé sous le nom de "LACRIBULE"), des solutions salines, des solutions isotoniques (par exemple, le "NEOCADRON" (Merck-Sharp-Dohme).

Ces véhicules peuvent contenir également des agents conservateurs comme les chlorures de benzylidiméthyl alcoyle d'ammonium ou l'éthylène diamine tétraacétate de sodium (EDTA).

Conformément à l'invention, la composition FGF-dextrane-liposome est incluse dans une forme galénique telle que pommade, crème, pâte, lotion ou imprégné un gel, notamment un gel de collagène.

Dans le cas de dextrans fonctionnalisés insolubles, ceux-ci peuvent également être inclus seuls ou associés au FGF dans des supports comme les crèmes, les gélatines ou gels de collagènes, ou sur des fibres synthétiques ou naturelles, supports habituels de pansements de recouvrement. L'inclusion des polymères fonctionnalisés insolubles peut se faire par addition de solution de collagène et gélification. Les procédures décrites dans une série de brevets de YANNAS peuvent être utilisées. Dans ces brevets (US 4 060 081), une composition laminaire composite donnant une peau équivalente dans laquelle la partie en contact avec la blessure est couverte de collagène réticulé avec un

9

glycosaminoglycane, le mélange étant obtenu par addition de glycosaminoglycane au collagène solubilisé, l'ensemble étant précipité ou réticulé par du glutaraldéhyde (Brevet US 4 418 691).

5 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de la composition conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il consiste à mélanger au moins un polysaccharide approprié avec au moins un FGF approprié.

10 Selon un mode de mise en œuvre avantageux du procédé de préparation conforme à l'invention, ledit polysaccharide est un dextrane substitué fonctionnalisé.

15 Selon une disposition préférentielle de ce mode de mise en œuvre, les dextrans substitués fonctionnalisés sont choisis dans le groupe qui comprend des dextrans solubles et des dextrans insolubles.

20 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé de préparation, lesdits FGFs sont obtenus par extraction et purification, à partir de sources naturelles.

De nombreux procédés de purification pour extraire et isoler les deux formes de FGFs à partir de ces sources naturelles (rétine, cerveau, hypophyse, placenta, rein etc...) ont été décrits dans l'Art antérieur.

25 Les méthodes préférées de la présente invention sont celles décrites dans Biochimie, 1986 (COURTY et al.) ou celle décrite dans la Demande de Brevet français 2 613 936, qui utilise la chromatographie d'affinité sur polystyrènes substitués biospécifiques.

30 Ces méthodes préférées incluent une étape de traitement de l'extrait tissulaire à pH très acide, excluant ainsi tout risque de contamination virale, et l'utilisation d'une chromatographie sur héparine immobilisée ou polystyrène substitué.

35 Les deux formes de FGF peuvent ainsi être isolées et séparées, avec les autres protéines ou individuel-

10

lement avec un degré de pureté suffisant pour être débarrassé de quantités significatives d'autres matériaux contaminants.

Salon un mode de mise en œuvre avantageux du s procédé de préparation conforme à l'invention, lesdits FGFs sont obtenus par synthèse chimique.

Salon encore un autre mode mise en œuvre avantageux du procédé de préparation conforme à l'invention, lesdits FGFs sont obtenus par des techniques de recombinai-10 son génétique appropriées.

Salon une disposition avantageuse de ces modes de mise en œuvre, lesdits FGFs sont d'origine humaine.

Salon une autre disposition avantageuse de ces modes de mise en œuvre, lesdits FGF proviennent d'autres 15 animaux, notamment d'autres mammifères.

Salon un autre mode de mise en œuvre du procédé de préparation conforme à l'invention, on ajoute à la composition obtenue au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou un support physiologiquement acceptable, 20 de manière à obtenir une formulation appropriée à l'application de ladite composition.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comporte encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à 25 des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'à des exemples montrant l'effet des dextranes substitués fonctionnalisés sur la protection de l'activité biologique des FGFs.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces 30 exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

11
Exemples

Exemple 1 : Procédé de stabilisation des FGF.

1) Préparation d'un dextrane substitué fonctionnalisé conforme à l'invention.

5 . 30 grammes de dextrane T40 (0,185 mole) sont dissous dans 146 ml d'eau distillée et refroidis à 4°C dans un bain de glace fondante. 59,2 g de NaOH (1,48 moles) sont dissous dans 100 ml d'eau distillée, puis refroidis à 4°C. La solution de soude est versée lentement dans la solution 10 de dextrane sous agitation et l'ensemble est maintenu à 4°C pendant 20 minutes. On ajoute alors 61 g de ClCH_2COOH (0,647 mole) très progressivement, afin que la température atteigne 20°C après 5 minutes. Le milieu réactionnel est alors porté à 40°C en 10 minutes et maintenu à cette température pendant 90 minutes, puis refroidi vers 20°C. Le pH 15 est abaissé vers 7 avec de l'acide acétique concentré. L'ensemble est précipité dans 2 litres de méthanol, filtré et lavé deux fois avec 1 litre d'éthanol, puis séché sous vide à 40°C.

20 . 10 g du polymère modifié précédent sont dissous dans 55 ml d'eau distillée acidifiée à pH 3. 60 ml de diméthylformamide sont ajoutés très progressivement sous agitation, en maintenant le pH à la valeur de 3. La température est abaissée à -15°C et 12,3 ml de N-méthylmorpholine sont ajoutés avec 14,5 ml de chloroformate d'isobutyle. On ajoute ensuite 12,2 ml de benzylamine. Après 30 minutes, le polymère est précipité dans 800 ml de méthanol filtré et séché.

30 . 9 g du polymère modifié précédent sont dissous dans 25 ml de dichlorométhane anhydre. Un mélange de 0,26 ml de HSO_3Cl et de 2,5 ml de dichlorométhane est ajouté dans le réacteur et l'ensemble est maintenu 4 heures à température ambiante. Après filtration et lavage par du dichlorométhane, le produit est séché, dissous dans 30 ml d'eau et le pH est ajusté à la valeur 7,0. La solution est ultrafiltrée contre une solution tampon, puis contre de

12

l'eau distillée. La solution est alors lyophilisée jusqu'à obtention du polymère sec.

2) Préparation du/des FGF.

- On traite le/les extraits cellulaires pendant une nuit en présence d'acide acétique à pH 3, puis on sépare les FGFs par chromatographie sur héparine immobilisée ou polystyrène substitué.

3) Préparation d'une composition stable de FGF conforme à l'invention.

- On prépare une solution de dextrane à partir du polymère sec obtenu en 1) en le mettant en solution dans un tampon phosphate isotonique (PBS), de manière à obtenir une concentration de 400 µg/ml.

- On met les FGFs extraits en 2) en solution dans ce tampon contenant les dextrans substitués appropriés, de manière à obtenir une concentration en FGFs de 100 µg/ml.

Exemple 2 : Bonnade stabilisée conforme à l'invention.

20	FGF	10 µg
	DF	5 mg
	Carboxyméthyl cellulose	2,5 g
	Eau purifiée stérile apyrogène	100 ml
25	DF = Dextrane fonctionnalisé de type E tel que défini dans le tableau III.	

La crème obtenue peut être appliquée sur une plaie de type scarification.

Exemple 3 : Pansement stabilisé conforme à l'invention.

30 Le support du pansement est constitué d'un film collagène "Pangil" des Laboratoires FOURNIER, imprégné par adsorption passive d'un mélange de FGF et de Dextrane fonctionnalisé dans les proportions suivantes :

35	FGF	10 µg
	DF	500 µg
	Solution de NaCl à 0,9 %	10 ml

Après incubation du film de collagène pendant 30 minutes à 4°C dans la solution décrite ci-dessus, on obtient un pansement pouvant être utilisé dans des cas d'ulcérations diverses, de plaies superficielles ou profondes.

Ce pansement peut être stocké sous vide et empaqueté.

* ETUDE DE L'EFFET DE POLYMERES BIOSPECIFIQUES FONCTIONNALISES SUR LA PROTECTION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES FGFs *in vitro*.

Méthodologie utilisée pour la mesure de l'activité biologique des FGFs *in vitro*.

Les méthodes d'évaluation *in vitro* de l'activité biologique des FGFs sont décrites dans de nombreuses publications, et sont toutes basées soit sur une mesure de l'augmentation du nombre de cellules induite par des doses croissantes de facteurs ajoutés au milieu de culture des cellules, soit sur une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée dans le DNA des cellules stimulées par le facteur de croissance. Dans les deux méthodes évoquées, ces augmentations sont dépendantes de la dose de facteur ajoutée, et l'on peut donc établir des effets dose et des courbes dose-réponse avec un effet maximal de stimulation. Par simplification, on définit une unité de stimulation comme la dose de facteur de croissance qui, ajoutée à un millilitre de milieu de culture sur des cellules cibles est capable d'induire une augmentation du nombre de cellules ou de l'incorporation de thymidine tritiée correspondant à la moitié (50 %) de la valeur maximale de cette augmentation mesurée dans la courbe dose-réponse. Cette définition et la reproductibilité de ces mesures sont exposées notamment dans PLOUET et al., 1984, *Cellular and Molecular Biology* 30, p 105.

14

EXEMPLE A : EFFET PROTECTEUR DU DEXTRAN SUBSTITUE CONTRE L'INACTIVATION DES FGFs ACIDE ET BASIQUE PAR DES pH ACIDES ET ALCALINS.

Dans ces expériences, les FGFs sont en solution à une concentration de 100 µg par millilitre, dans un tampon phosphate isotonique (PBS) ne contenant pas de dextrane (témoin) ou contenant du dextrane substitué à 400 µg/ml. 10 µl de ces différentes solutions sont prélevés et mélangés soit à 1 ml de tampon PBS, d'acide acétique (CH_3COOH) dilué ajusté à pH 2 (environ 1 N), soit de soude (NaOH) diluée ajustée à pH 9,0. Ces échantillons sont incubés à 20°C pendant deux heures et un prélèvement de 1 µl est effectué pour le dosage de l'activité biologique.

La figure 1 présente la courbe dose-réponse du bFGF sur des fibroblastes CCL39.

Cette figure comporte en abscisse le logarithme de la concentration de bFGF en pg/ml et en ordonnée la pourcentage de stimulation.

La courbe 1 correspond au témoin ; la courbe 2 correspond au bFGF seul à pH 2 ; la courbe 3 correspond au bFGF en présence de dextrane à pH 2 ; la courbe 4 correspond au bFGF en présence de dextrane à pH 9 ; la courbe 5 correspond au bFGF seul à pH 9 et la courbe 6 correspond au témoin en présence de dextrane.

L'augmentation d'incorporation de thymidine tritiée représente la valeur du nombre de coups par minute (cpm) obtenus au plateau de la courbe dose-réponse du bFGF seul moins la valeur en cpm de thymidine tritiée incorporée dans les cellules en absence de FGF et déterminée dans la même expérience.

Les courbes 3 et 4 montrent que le bFGF en présence de dextrane conserve son pouvoir de stimulation tant en milieu acide que basique.

Le tableau I résume les résultats obtenus avec les FGFs acide et basique. L'unité de stimulation est arbi-

trairement fixée à 1 pour le aFGF ou le bFGF de départ, incubé deux heures à 20°C.

TABLEAU I

5

		pH 2	pH 7	pH 9
	FGFB (0°C)		0,9	
10	FGFB (2 H, 20°C)	52	1	13
	FGFB + DF (2 H, 20°C)	1	1	2,5
	FGFB + HS (2 H, 20°C)	3	1	4
15	FGFa (0°C)		1	
	FGFa (2 H, 20°C)	6	1	6
	FGFa + DF (2 H, 20°C)	0,8	0,4	2
20	FGFa + HS (2 H, 20°C)	1,5	0,8	4,5

DF = dextrane fonctionnalisé : dans cet exemple, il s'agit du dextrane E tel que défini dans le tableau III, ci-après.

H.S. = heparane sulfate : (Société BIOVALORIS à Plouharnel (Ille-et-Vilaine, FRANCE)).

Ce tableau montre l'effet protecteur du DF (Dextrane fonctionnalisé) contre l'inactivation des FGFs acide et basique induite par des pH acides et alcalins.

L'incubation du FGF basique pendant deux heures à 20°C dans une solution tampon pH 2 à 9 induit une inactivation de l'activité biologique du FGF basique.

16

En effet, il faut 53 fois plus de produit à pH acide et 13 fois plus à pH basique pour induire un effet biologique équivalent à celui du produit initial.

5 L'ajonction de DF à ce mélange protège totalement l'activité biologique du FGF basique contre des incubations à pH 2 ou 9.

Des résultats similaires sont observés dans le cas du FGF acide concernant les deux types de traitement.

EXEMPLE B : EFFET DU DEXTRANE FONCTIONNALISE
10 (DF) SUR L'INACTIVATION DES FGPs PAR LA TEMPERATURE A COURT
TERME ET LONG TERME.

15 Dans cet exemple, le FGF préparé comme dans l'exemple A est incubé à 4°C, 20°C, 37°C ou 60°C pendant différents temps, en l'absence ou en présence de 400 µg de dextrane fonctionnalisé (DF) tel que défini dans le tableau III ci-après, puis dosé.

Les résultats sont présentés dans le tableau II ci-après.

20

25

30

35

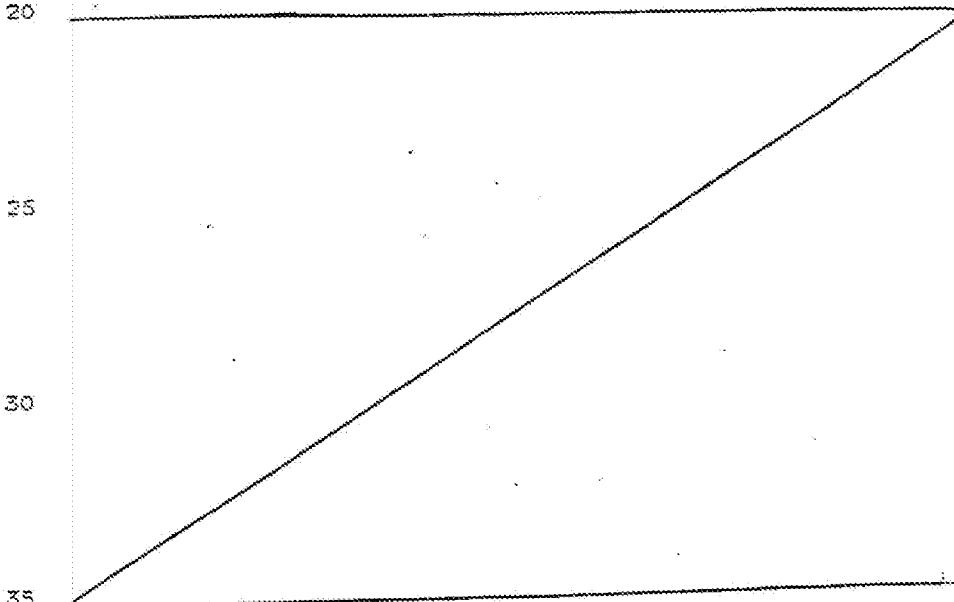


TABLEAU II

		4°C	20°C	37°C	60°C
	bFGF t=0'	1			
	bFGF t=30'	1	2	3,8	> 100
10	bFGF + DF t=30'	1	2	2	8
	aFGF t=0'	2			
	aFGF t=30'	1	1	2	> 100
	aFGF + DF t=30'	0,4	0,4	0,4	5
15	bFGF t=24 H	1	1	6	
	bFGF + DF t=24 H	1	2	1	
	aFGF	1	1	1	
	aFGF + DF	0,4	0,4	0,4	
20	bFGF t=7 jours	2	5	> 100	
	bFGF + DF t=7 jours	1	2	2	
	bFGF + H.S. t=7 jours	1	2	6	
	aFGF t=7 jours	2,5	8	> 100	
25	aFGF + DF t=7 jours	0,4	0,4	3	

30

35

DF = dextrane fonctionnalisé

HS = héparane sulfate

L'unité de stimulation initiale est fixée arbitrairement à une valeur égale à 1.

Dans ce tableau, on observe une forte inhibition de l'activation du FGF acide ou basique induit par un traitement d'une semaine à 37°C. La présence du DF dans le milieu d'incubation protège les deux types de FGF contre la dénaturation thermique.

EXEMPLE C : EFFET DE DIFFERENTS DEXTRANES FONCTIONNALISES SUR LES EFFETS DOSE-REPONSE DU FGF.

L'effet de différents dextranes fonctionnalisés est mesuré à l'unité sur le tableau III ci-dessous.

18

TABLEAU III

Dérivés dextrans	% D	% W	% X	% Y	R/us
20	A	100	0	0	1
	B	0	105	0	1,6
	C	0	84	21	1,7
	D	10	76	0	2,6
	E	0	89	6	2,36
	F	0	74	16	3,1
	G	65	30	1	2,54
	H	29	42	24	2,1

Pourcentage :

20 D : Dextrane

W : Acide méthylcarboxylique

X : Benzylamide

Y : Benzylamidesulfonate

25 R/us est la valeur du rapport des valeurs des unités de stimulation du aFGF sans dextrane fonctionnalisé divisée par l'unité de stimulation en présence de dextrane fonctionnalisé.

* ETUDE DE L'EFFET DE POLYMERES BIOSPECIFIQUES
FONCTIONNALISES SUR LA PROTECTION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE
DES FGFs *in vivo*

Exemple 3 : ETUDES CINETIQUE, PLANIMETRIQUE ET
5 HISTOLOGIQUE DE L'EFFET CICATRISANT DE L'ASSOCIATION
FGF/DEXTRANE FONCTIONNALISE.

Protocole expérimental :

Les opérations sont réalisées sur des rats Wistar mâles de 300 à 400 grammes. Chaque expérience est effectuée sur une série de 5 animaux.

10 Types de plaies :

Deux types de plaies cutanées sont effectuées sur la face dorsale des animaux, préalablement rasée.

15 - Les prélèvements sont effectués par punch (0,6 cm de diamètre) jusqu'au plancher musculaire.

- Des scarifications de 1 cm de long sont pratiquées au scalpel. Elles n'affectent pas la région dermo-épidermique.

Mode opératoire :

20 Selon le type de plaies, les blessures sont traitées par différents mélanges de produits en solution dans du sérum physiologique tamponné (pH 7,4) stérilisé.

Ces solutions sont déposées pour les plaies par punch dans un tampon collagène (GINGESTAT) pré découpé aux mesures exactes de l'excision tissulaire.

25 Dans le cas des scarifications, les produits sont déposés directement sous forme liquide sur la plaie.

Les effets de l'association FGF (basique ou acide ou un mélange en solution de 1 ng à 10 µg/ml) et des 30 dextranes fonctionnalisés (en solution de 100 ng à 1 mg/ml) sont évalués et comparés à l'action de chacun des constituants, considérés comme témoins de réaction (collagène, solution de dissolution, FGF, dextrane fonctionnalisé).

Chaque série expérimentale d'animaux est sacrifiée à intervalle de temps défini par période de 24 heures,

et les régions lésées sont prélevées pour deux types d'étude :

- une analyse morphologique externe avec planimétrie de la plaie ;
- une étude histologique.

Résultats :

I - Effets stabilisants des dextrans fonctionnalisés :

10 Du FGF marqué radioactivement à l'iode ^{125}I est déposé en présence ou en absence de dextrane fonctionnalisé dans un tampon de collagène.

La variation de la radioactivité dans le collagène imprégné est appréciée en fonction du temps.

15 Les résultats sont illustrés dans la figure 2, qui comporte en abscisse le temps en heure et en ordonnée, le pourcentage de radioactivité. La courbe 7 correspond au FGF en présence de dextrane et la courbe 8 correspond au FGF seul.

20 La radioactivité est mesurée dans le gel de collagène et dans des prélèvements effectués en périphérie de la plaie, à 2 cm de celle-ci, par un punch équivalent à celui d'origine.

II - Etudes morphologique et histologique :

A) Etude morphologique :

25 L'observation de l'évolution des plaies à l'œil nu permet de constater une action très nette de l'association FGF + dextrane fonctionnalisé sur la vitesse et la qualité de la cicatrisation superficielle (épidermisation + lyse du caillot).

30 1) Après 24 heures, les tampons de collagène imprégnés par cette association ont totalement adhéré aux parois de la plaie, et ne peuvent être prélevés que par lésions des tissus régénérés. Les expérimentations témoins ne manifestent une adhérence totale des collagènes qu'au bout 35 de 36 à 48 heures.

21

2) La réépithérialisation est visible à l'œil nu au bout du troisième jour, en présence de l'association FGF + dextrane fonctionnalisé, alors qu'une image identique sur les contrôles demande des temps d'expérimentation de 5 à 7 jours.

3) Analyse planimétrique : l'analyse planimétrique de la surface externe des plaies montre l'absence totale de rétraction des tissus en régénération.

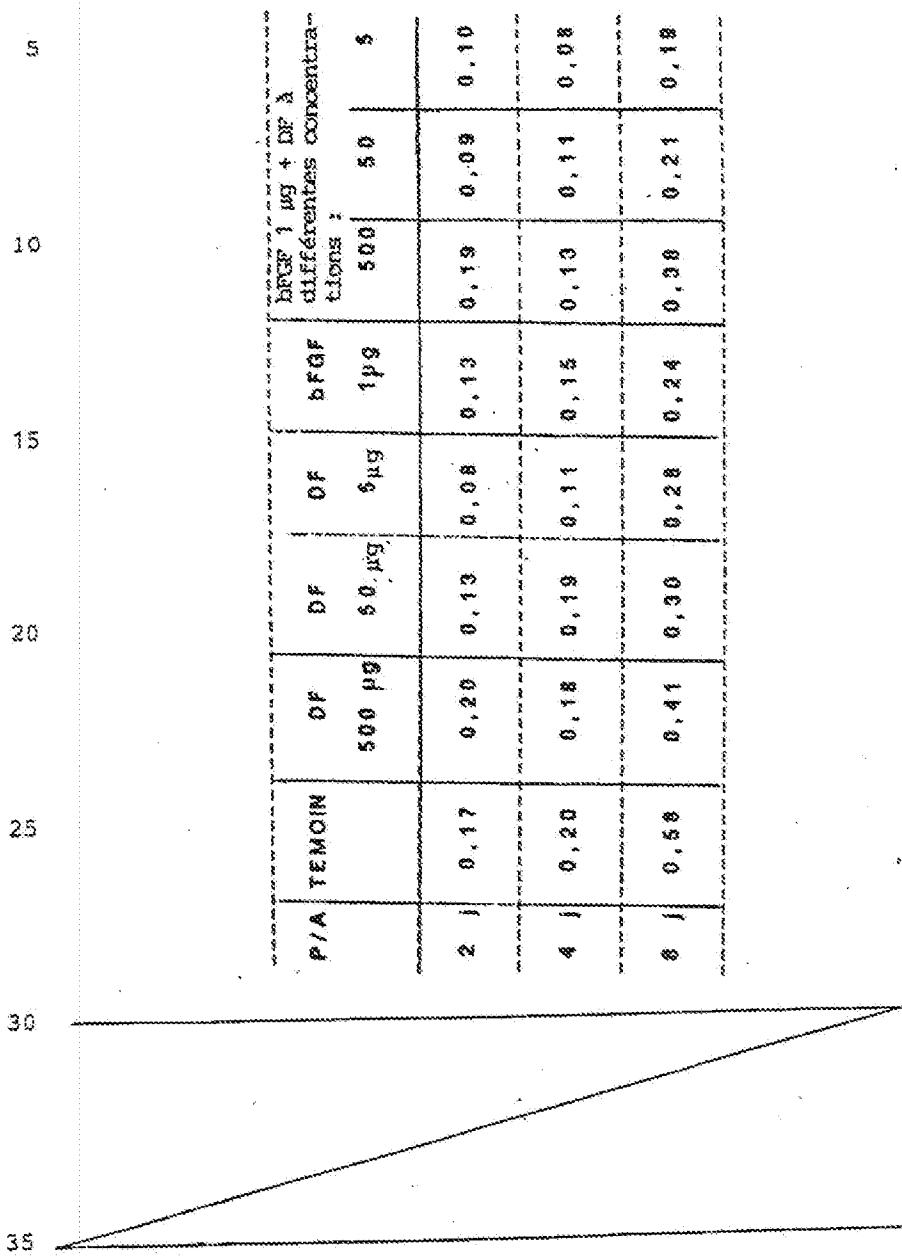
Le taux de rétraction cicatricielle est évalué 10 en fonction du temps en considérant le rapport P/A où P est le périmètre de la plaie et A la surface de la cicatrice.

L'ordre de grandeur de ce rapport P/A est du type K/R où K est une constante et R le rayon de la plaie originelle circulaire.

15 En fonction du temps, plus ce rapport est faible et constant, plus la cicatrice conserve une planimétrie proche de celle de la lésion d'origine. Par conséquent, plus le rapport P/A est faible, plus le taux de restructuration cicatriciel est limité. La qualité de cicatrisation peut ainsi être reflétée par l'absence de contraction.

20 Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 3, qui comporte en abscisse le temps en jour et en ordonnée le rapport P/A . Le taux de rétraction est représenté par pour le témoin ; par pour le bFGF ; par pour les FGFs en présence d'héparane sulfate et par pour les FGFs associés aux dextrane fonctionnalisés.

25 Les résultats sont également présentés dans les tableaux IV et V ci-après ; le tableau IV donne le pourcentage de l'aire témoin en fonction de la quantité de dextrane fonctionnalisé en présence ou en l'absence de bFGF ; le tableau V donne le rapport P/A dans les mêmes conditions.

22
TABLEAU IV

23
TABLEAU V

S	DF	bFGF 1 µg + DF à différentes concentrations :					
		500 µg	50 µg	5 µg	bFGF 1 µg	500	50 µg
8	3	125	104	173	147	112	160
10	4	105	813	180	169	182	231
15	8	280	128	145	386	329	237
							253

Les effets des dextranes fonctionnalisés sur cette rétraction sont particulièrement visibles aux quatrième et huitième jours après l'opération.

La rétraction est très faible en comparaison avec celles observées dans les expérimentations témoins ou celles observées en présence des FGFs seuls ou associés à des héparanes sulfates, conditions déjà nettement plus favorables que celles du témoin.

B) Etude histologique

Les régions traitées sont prélevées, fixées, imprégnées en paraffine. L'étude histologique est réalisée sur des coupes de 7 µm. Les colorations utilisées permettent des études topographiques et histochimiques.

L'analyse histologique montre que l'association FGF + DF accélère les étapes traditionnelles de la cicatrisation dermocépidermique et augmente la qualité des tissus reconstitués.

Le collagène imprégné permet une colonisation très rapide (1 jour) des catégories cellulaires environ-

nantes (fibroblastes, musculaires lisses) à partir des tissus environnants sains, et en particulier à partir du conjonctif du plancher musculaire strié sous-jacent.

Dans le même temps, une néoangiogénèse permet au tissu en formation d'être colonisé par une densité très forte de capillaires sanguins. Au bout de trois jours (contre cinq à six pour les témoins), la réépithérialisation engagée à partir de l'épiderme des lèvres de la plaie arrive à affrontement. Le quatrième jour, l'épiderme est totalement reconstruit et les tissus sous-jacents, totalement réorganisés, présentent une densité normale comparativement aux témoins, à la densité beaucoup plus faible. Ces mêmes illustrations révèlent l'absence de rétraction des bords de la plaie pour les punchs traités par l'association FGF + dextranes fonctionnalisés, contrairement aux témoins qui combinent, par extraction, les tissus excisés.

Les effets de l'association des bFGF et des dextranes fonctionnalisés sur la qualité de la cicatrisation, comparés à une cicatrisation naturelle sans adjonction de produits sont présentés sur les figures 4 et 5.

La figure 4 présente une photographie d'une coupe histologique d'une cicatrisation témoin (absence de traitement) quatre jours après la réalisation de la plaie (X 40). La figure 5 présente la photographie d'une coupe histologique d'une cicatrisation après traitement par un tampon de collagène imprégné d'une solution de bFGF à 1 µg/ml et de dextranes fonctionnalisés à 50 µg/ml, quatre jours après la réalisation de la plaie et au même grossissement de 40.

La figure 5 montre l'épiderme (E) reconstruit entièrement alors que sur la figure 4, il n'est pas reformé. Une rétraction des tissus environnants sur la plaie témoin n'est pas enregistrée sur la plaie traitée. Cet espace cicatriciel, relativement anarchique en figure 4, présente pour la plaie traitée (figure 5) une organisation et une densité cellulaire satisfaisante. Il se caractérise par une densité cellulaire élevée et une organisation régulière des tissus.

25

térise par la présence de vaisseaux sanguins traduisant l'effet angiogénique local de l'association des produits de cette invention.

Il apparaît donc que l'association bFGF + dextrane fonctionnalisé se présente comme un puissant agent cicatrisant *in vivo*, accélérant d'une part les processus naturels régénératifs, et permettant d'autre part une qualité accrue de la cicatrisation par l'absence de tout phénomène de rétraction comme la mobilisation rapide des différentes catégories cellulaires nécessaires à la restauration tissulaire.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1') Composition à base de FGF, caractérisée en ce qu'elle comprend, pour sa stabilisation un polysaccharide associé avec au moins un FGF acide et/ou un FGF basique et/ou un dérivé et/ou un analogue et/ou un fragment de ceux-ci présentant une activité biologique.

2') Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est un dextrane substitué fonctionnalisé approprié.

3') Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que les dextrans substitués fonctionnalisés sont choisis dans le groupe qui comprend des dextrans solubles et des dextrans insolubles, lesdits dextrans étant capables de restaurer partiellement ou totalement l'activité biologique du/des facteurs FGF acides et/ou basiques inactivés par un stockage de longue durée ou la température.

4') Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,1 à 1 000 µg/ml d'un ou plusieurs dextrans substitués fonctionnalisés et de 0,01 ng à 300 µg de FGF acide et/ou de FGF basique et/ou d'un dérivé et/ou un analogue et/ou un fragment de ceux-ci présentant une activité biologique.

5') Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend, de plus, d'autres principes actifs associés.

6') Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdits principes actifs sont choisis dans le groupe qui comprend notamment les anesthésiques locaux, les antiinfectieux, des protéines sériques, du collagène.

7') Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable approprié et/ou un support physiologiquement acceptable.

27

8') Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que le véhicule est de l'eau et en ce que ladite composition comprend, en outre, des tampons et/ou des sels, de manière à maintenir le mélange approximativement à un pH compris entre 6,8 et 7,4 et à une force ionique comprise entre 0,1 et 0,2.

9') Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est incorporée à des liposomes appropriés.

10 10') Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que le support est choisi dans le groupe qui comprend notamment les pansements et les biomatériaux.

15 11') Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle est incluse dans une forme galénique telle que pommade, crème, pâte, lotion ou imprègne un gel, notamment un gel de collagène.

12') Procédé de préparation de la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il consiste à mélanger au moins un polysaccharide approprié avec au moins un FGF approprié.

13') Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que lesdits FGFs sont obtenus par extraction et purification, à partir de sources naturelles.

25 14') Procédé de préparation selon la revendication 12, caractérisé en ce que lesdits FGFs sont obtenus par synthèse chimique.

15') Procédé de préparation selon la revendication 12, caractérisé en ce que lesdits FGFs sont obtenus par des techniques de recombinaison génétique appropriées.

16') Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que lesdits FGFs sont d'origine humaine ou proviennent d'autres animaux, notamment d'autres mammifères.

35 17') Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, caractérisé en ce que

28

l'on ajoute à la composition obtenue au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou un support physiologiquement acceptable, de manière à obtenir une formulation appropriée à l'application de ladite composition.

2644066

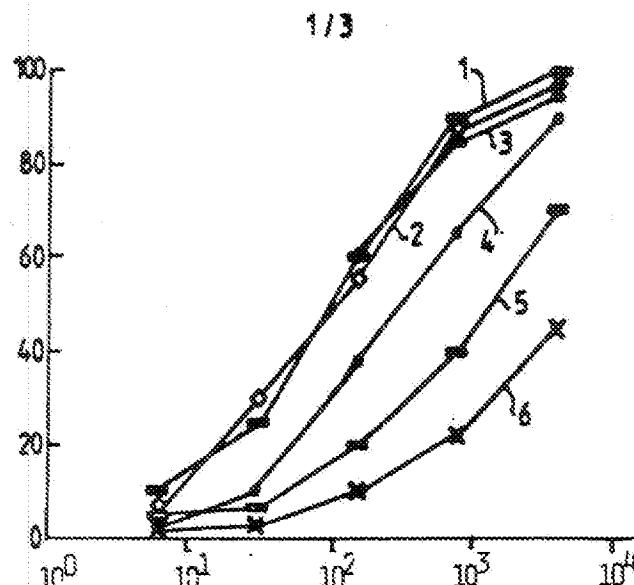


FIG.1

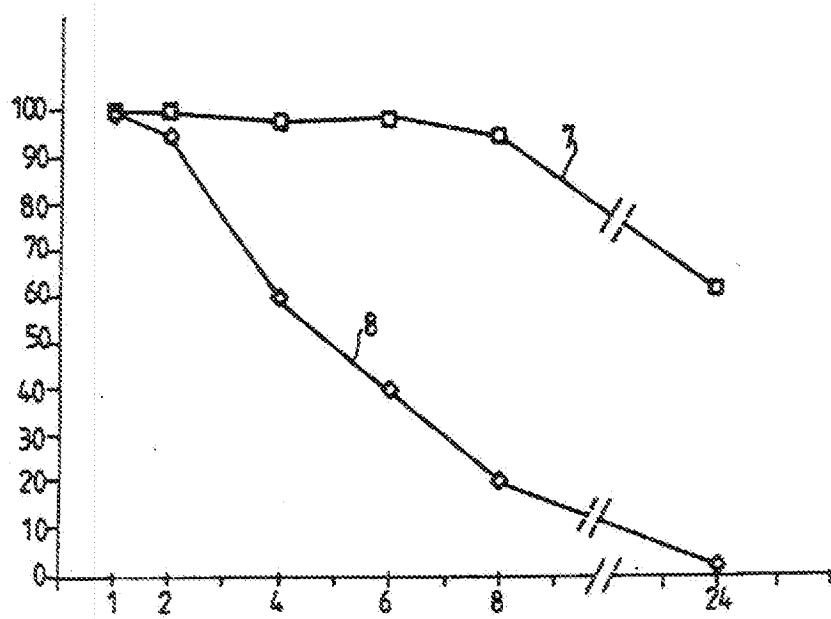


FIG.2

2644066

2/3

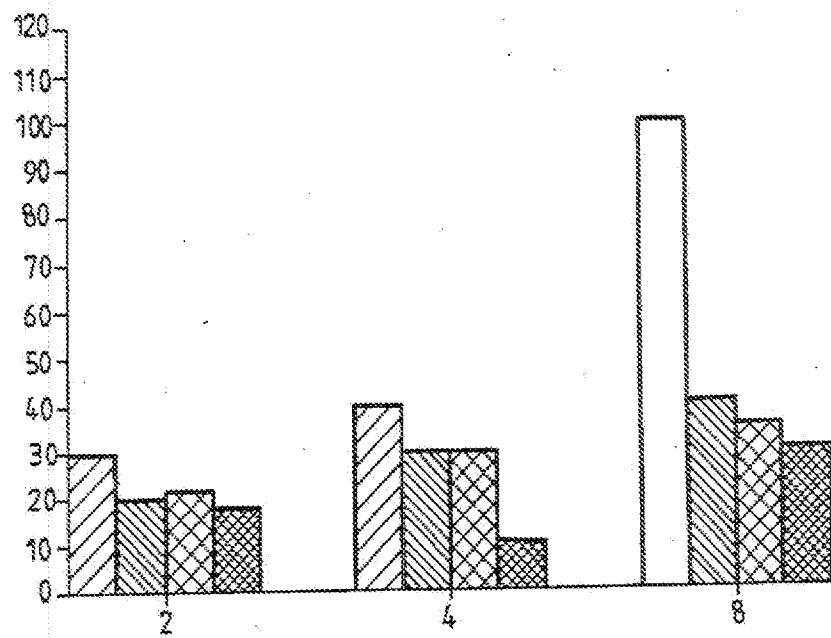


FIG.3

2644066

313

FIG. 4

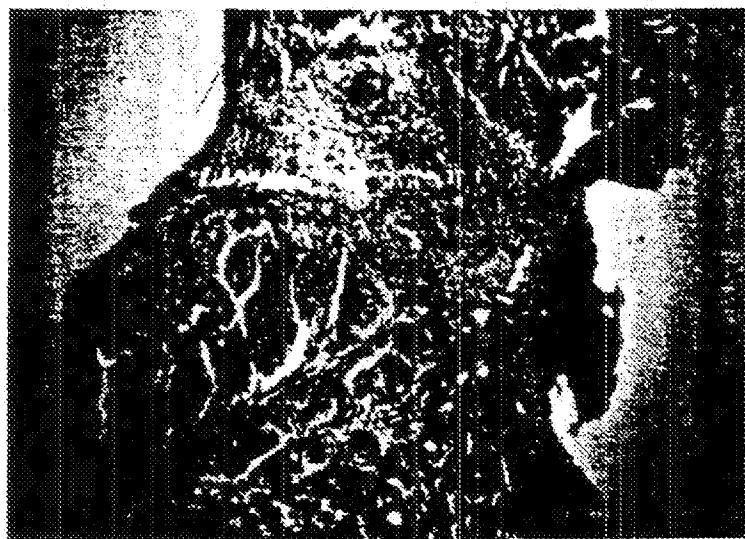


FIG. 5

